

09/70038

13.05.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 02 JUL 1999

WIPO PCT

EJU

JP99/12477

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 5月14日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第131771号

出願人

Applicant(s):

持田製薬株式会社

PRIORITY

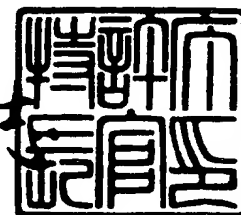
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山佐 建志



出証番号 出証特平11-3039270

【書類名】 特許願
【整理番号】 MD0477
【提出日】 平成10年 5月14日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 48/00
【発明の名称】 肝硬変予防・治療剤
【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区片平1-2-35-206

【氏名】 上野 義之

【特許出願人】

【識別番号】 000181147

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目7番地

【氏名又は名称】 持田製薬株式会社

【代表者】 持田 英

【代理人】

【識別番号】 100080159

【郵便番号】 101

【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号

千代田岩本

ビル4階

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 望稔

【電話番号】 3864-4498

【選任した代理人】

【識別番号】 100090217

【郵便番号】 101

【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号

千代田岩

本ビル 4 階

【弁理士】

【氏名又は名称】 三和 晴子

【電話番号】 3864-4498

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006910

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 (FERMBP-5535) 受託証の謄本 1

【物件名】 (FERMBP-5854) 受託証の謄本 1

【物件名】 (FERMBP-5855) 受託証の謄本 1

【包括委任状番号】 9715033

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肝硬変予防・治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】

Fasアンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤。

【請求項2】

前記FasアンタゴニストがFas-Fasリガンドの結合を抑制する物質である請求項1に記載の予防・治療剤。

【請求項3】

前記FasアンタゴニストがFas誘導体である請求項1または2に記載の予防・治療剤。

【請求項4】

前記Fasアンタゴニストが抗Fasリガンド抗体である請求項1または2に記載の予防・治療剤。

【請求項5】

前記肝硬変が胆汁性肝硬変である請求項1～4のいずれかに記載の予防・治療剤。

【請求項6】

前記肝硬変が原発性胆汁性肝硬変である請求項5に記載の予防・治療剤。

【請求項7】

前記胆管消失症候群が免疫学的機序による胆管消失症候群である請求項1～4のいずれかに記載の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はFasアンタゴニストを有効成分として含有することを特徴とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

Fasは、ヒト線維芽細胞でマウスを免疫して得られたモノクローナル抗体であるFas抗体(Yonehara S. 等、J. Exp. Med., 169巻、1747-1756頁、1989年)によって認識され、アポトーシスのシグナルを細胞に伝達する細胞表面抗原である。Itoh N. 等によって、Fas遺伝子がクローニングされ、Fasが約45kDの細胞膜上の蛋白質であり、そのアミノ酸配列からTNFレセプターファミリーに属することが判明した(Cell, 66巻、233-243頁、1991年)。また、マウスFas遺伝子もクローニングされ、Fas mRNAが、マウスの胸腺、肝、肺、心臓、卵巣で発現していることが確認された(Watanabe-Fukunaga等、J. Immunol., 148巻、1274-1279頁、1992年)。

【0003】

ヒトFasリガンドは、Fasを発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する生体内分子として、Nagata等により報告されたポリペプチドである(Takahashi T. 等、International Immunology, 6巻、1567-1574頁、1994年)。ヒトFasリガンドは、TNFファミリーに属する分子量約40kDのII型糖蛋白質で、TNFと同様に、生体内で3量体を形成すると考えられている(Tanaka M. 等、EMBO Journal, 14巻、1129-1135頁、1995年)。また、ヒトFasリガンドはラットFasリガンド(Suda T. 等、Cell, 75巻、1169-1178頁、1993年)やマウスFasリガンド(Takahashi T. 等、Cell, 76巻、969-976頁、1994年)と細胞外領域において高いホモロジーを有しており、ヒトFasリガンドはヒトFasのみでなくマウスFasをも認識し、アポトーシスを誘導することができる。逆に、ラットFasリガンド及びマウスFasリガンドも、ヒトFasを認識してアポトーシスを誘導することができる。

【0004】

また、Fasを介するアポトーシスの細胞内シグナル伝達機序に関しても研究が進んでおり、Fasの細胞内領域、特にデスドメイン(Death domain

in) と呼ばれる領域と相互作用してシグナルを伝達または抑制する因子の同定及びクローニングが報告されている他、インターロイキン-1変換酵素(ICE)関連チオールプロテアーゼがFasを介するアポトーシスのシグナル伝達に寄与している可能性が示唆されている。

近年、アポトーシス、特にFasを介するアポトーシスと種々の疾患及び生理現象との関連が示唆されている。たとえば、ウイルス性劇症肝炎における肝細胞死及びある種の自己免疫疾患等において、Fasを介するアポトーシスの異常が関与する可能性が示唆されている。

また、Fas/Fasリガンド系はアポトーシス以外の機能、たとえば、好中球に作用して起炎症性に働く作用等も担っている可能性が示唆されている(Kayaki N. 等、臨床免疫 28巻、667-675頁、1996年)。

【0005】

肝硬変は慢性進行性肝疾患の末期的症状であり、広範な線維化と再生結節を伴う肝小葉構造の改築を来した病変であり、肝炎とは区別される。線維増生、結節形成による門脈の圧迫、類洞の狭小化などにより血流の減少、肝細胞への酸素、基質供給不全が起こり、これにより肝細胞機能不全が起こり、また肝細胞壊死が惹起されるという悪循環が繰り返される。さらにこのような肝臓の形態的変化が門脈圧亢進を来し、食道静脈瘤、腹水などの合併症をもたらす。成因はウイルス性、薬物性、アルコール障害性、寄生虫性、うっ血性、胆汁性及びその他(Wilson病等)に分けられる(Kamata, T.、日本内科学会雑誌 80巻、1561-1562頁、1991年、Harada, T.、日本内科学会雑誌 80巻、1563-1567頁、1991年、Okudaira, M.、日本内科学会雑誌 80巻、1568-1571頁、1991年)。

肝硬変の成因に対する治療は困難なことが多く、安静及び食事療法により肝細胞の代謝及び再生を促進し、肝障害の進展を少しでも抑制することが治療の中心となっている。近年、肝蛋白質合成促進薬、線維化抑制薬等が検討されているが、未だ不十分である(消化器疾患最新の治療 '95-'96、Niwa H. 等監修、肝硬変、Murawaki Y. 等著、302-307頁、1997年)。

胆管消失症候群は肝内胆管が広汎に消失し、胆汁うっ滞が遷延する病態である。広汎な肝内胆管消失後には種々の2次的な病変が管内に発生する。これらの胆管消失の多くは不可逆性である。周囲に種々の程度の線維化及び好中球を含む炎症性細胞の浸潤がみられ、この他に肝細胞の腫大及び淡明化、肝細胞内への銅顆粒の沈着、並びにマロリ体の出現等の慢性の胆汁うっ滞像がみられる。最終的にははめ絵状の再生結節が出現し、胆汁性肝硬変へと移行する。一部の肝内胆管が再生する例では、管腔に乏しく不規則な分枝を示す細胆管の高度な増生がみられ、胆汁うっ滞が改善する。これは肝細胞が化生した結果と考えられている。胆肝消失が肝内に限局した場合、その領域の肝萎縮及び線維化がみられるが、細胆管反応及び胆汁うっ滞像は通常みられない(Nakanuma Y.、肝胆膵、26巻、363-370頁、1993年)。

胆汁性肝硬変は遷延する胆汁うっ滞に続いて起こる病変であり、肝臓は硬く緑色調の強い顆粒状ないし結節状を示す疾患である。門脈行きの幅広い線維化が進展して隣接門脈域間で結合し肝小葉を輪状に囲み、線維束は小葉中心帯と連なることもある。胆石症や慢性胆管炎などの胆道系疾患による胆道狭窄や不完全閉塞で見られる続発性と原発性がある。

【0006】

原発性胆汁性肝硬変は代表的な自己免疫性肝疾患であり、肝外胆管に閉塞要因が存在しないにもかかわらず、長期にわたって胆汁うっ滞をきたし、末期には肝硬変の病像を呈する病因不明の難治性肝疾患である。自己免疫性疾患として特徴づけられるのは、抗糸粒体(antimitochondrial antibody, AMA)の存在であり、抗核抗体等が陽性である症例も一部にみられる。また自覚症状により無症候性(a-PBC)と症候性(s-PBC)に分類されている。病理学的には、一次的障害部位は直径40~80 μ mの中等大の小葉間胆管ないしこれより太い隔壁胆管にあると考えられ、初期病変は慢性非化膿性破壊性胆管炎(CNSDC)が生じ本症に特徴的な組織所見である。これら胆管レベルでは上皮細胞の乳嘴状増殖、上皮細胞の変性・壊死、ときに脱落をきたす。また、その近傍には、胚中心をもつリンパ球集簇または胆管周囲に肉芽腫を認める場合があり、組織球様細胞、類上皮細胞を伴い、サルコイドーシス類似の

形態を示すこともある。形態的变化はScheuer分類により、I期がCNS DCの所見の見られる時期(CNS DC期、florid duct lesion)、II期が細胆管増殖が著明で小葉間胆管の消失を認める時期(細胆管増生期、ductular proliferation)、III期が炎症反応が軽減し種々の濃度の線維化を認める時期(瘢痕期、scarring)で、IV期が硬変期(肝硬変期、cirrhosis)に分類されている(井上恭一等、医学のあゆみ別冊消化器疾患II、肝・胆・脾、356-360頁、1993年、大西弘生等、月間薬事、32巻、151-157頁、1990年)。

【0007】

現在、薬剤療法としては対症療法的にウルソデオキシコール酸(UDCA)が用いられているが、対症療法として継続投与が必要であり、完治には至らず、進行度合いにより改善が期待できない症例もある(今日の治療指針1997、Hinohara S.等監修、原発性胆汁性肝硬変、Tanaka N.著、408-409頁、1997年、Kajiya G.等、治療78巻増刊号(標準処方ガイド 原発性硬化性胆管炎)、854-856頁、1996年)。

動物の肝細胞障害モデルにおいてFasが肝細胞の増殖性変性の調節に関与していること、各種ヒト肝疾患においてFasの発現が増強されており、この増強にはインターフェロン- γ 等のサイトカインが関与している可能性が高いこと、また同疾患においてFasリガンドの発現も増強されていること等が報告されている(Ryou K.等、現代医療、29巻、165-169頁、1997年)。さらに同報告ではウイルス性肝炎ではFasシステムにより、アルコール性肝硬変では肝炎とは異なるアポトーシスの機序が推察されている。またFasを利用した肝疾患の診断・治療として、肝疾患群の血中可溶性Fasを測定することによる肝疾患の評価方法(特許出願公開公報特開平9-72901)及びヒトFasリガンド抗体を有効成分とする肝炎治療剤(特許出願公開公報特開平9-124509)が知られている。しかしながら、上記肝硬変の病態にFas/Fasリガンドを介したアポトーシスが、直接または間接的に関与しているかどうかは依然として不明であり、Fasアンタゴニストによる肝硬変の予防剤・治療剤は知られていない。

H a r a d a, K. 等及びT. K u r o k i等は小葉肝胆管等の組織学的検討において、アポトーシス細胞の散見及びF a sの発現が正常肝よりも原発性胆汁性肝硬変症例の肝に多いと報告した（肝臓、38巻、suppl. 195頁、1996年、Virchows Arch, 429巻、119-129頁）。しかしながら、上記原発性胆汁性肝硬変の病態にF a s/F a sリガンドを介したアポトーシスが、直接若しくは間接的に関与しているかどうかは依然として不明であり、F a sアンタゴニストによる原発性胆汁性肝硬変の予防剤・治療剤は知られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、F a sアンタゴニストという新規な作用機序による肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤を提供することである。より詳しくは、本発明はF a sアンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤及び治療方法を提供する。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、肝硬変または胆管消失症候群患者を救うべく、F a sを介するアポトーシスと当該疾患の関連性を鋭意研究してきたが、肝硬変または胆管消失症候群モデルにおいてF a sアンタゴニストが病態を改善することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記の予防・治療剤に関するものである。

(1) F a sアンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤。

(2) 前記F a sアンタゴニストがF a s-F a sリガンドの結合抑制する物質である(1)に記載の予防・治療剤。

(3) 前記F a sアンタゴニストがF a s誘導体である(1)または(2)に記載の予防・治療剤。

(4) 前記F a sアンタゴニストが抗F a sリガンド抗体である(1)または(2)に記載の予防・治療剤。

(5) 前記肝硬変が胆汁性肝硬変である(1)～(4)のいずれかに記載の予防・治療剤。

(6) 前記肝硬変が原発性胆汁性肝硬変である(5)に記載の予防・治療剤。

(7) 前記胆管消失症候群が免疫学的機序による胆管消失症候群である請求項(1)～(4)のいずれかに記載の予防・治療剤。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下にさらに詳細に本発明を説明する。

本発明の予防・治療剤の対象となる肝硬変には種々の疾患が含まれる。成因別に分類すると、自己免疫性肝硬変、胆汁性肝硬変、ウイルス性肝硬変、アルコール障害性肝硬変、代謝異常症による肝硬変、うっ血による肝硬変、肝毒物質による肝硬変、寄生虫性肝硬変または栄養障害性肝硬変に大別される。好ましくは、自己免疫性肝硬変または胆汁性肝硬変が本発明の対象となる。また、本発明の予防・治療剤の対象となる胆管消失症候群には種々の疾患が含まれる。肝内胆管消失を成因別に分類すると、遺伝的要因、免疫学的要因、感染要因、血管障害または化学物質による胆管消失をきたす疾患それぞれが本発明の対象となる。なお、胆管消失症候群は同義語として「syndorome of disappearing intrahepatic bile ducts」、「ductopenia」、「vanishing bile duct syndorome (desease)」または「ductpenic rejection」等の名称が使用されている。

【0011】

自己免疫性肝硬変には原発性胆汁性肝硬変またはルポイド肝炎が含まれる。

胆汁性肝硬変には原発性胆汁性肝硬変または続発性胆汁性肝硬変が含まれる。

好ましくは、原発性胆汁性肝硬変が本発明の対象となる。

ウイルス性肝硬変にはB型肝炎ウイルス由来肝硬変、C型肝炎ウイルス由来肝硬変またはその他の肝炎ウイルス由来の肝硬変が含まれる。

【0012】

代謝異常症による肝硬変にはヘモクロマトーシス由来肝硬変、ウィルソン病（

Wilson病)由来肝硬変、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠損症由来肝硬変、ポルフィリン症由来肝硬変、糖原病由来肝硬変、IV型グリコーゲン合成由来肝硬変、ガラクトース血症由来肝硬変及び先天性チロジン血症由来肝硬変、C型肝炎ウイルス由来肝硬変またはその他の肝炎ウイルス由来の肝硬変が含まれる。

うっ血による肝硬変には肝静脈閉塞症由来肝硬変、バッド・キアリ症候群(Budd-Chiari症候群)由来肝硬変、長時間持続した収縮性心膜炎由来肝硬変またはうっ血性心不全由来肝硬変が含まれる。

肝毒物質による肝硬変にはあさり中毒由来肝硬変、黄変米由来肝硬変、アフラトキシン由来肝硬変、四塩化炭素由来肝硬変またはメソトレキセート抗生物質由来肝硬変が含まれる。

寄生虫性肝硬変には日本住血吸虫由来肝硬変、肝ジストマ由来肝硬変または肝蛭由来肝硬変が含まれる。

栄養障害性肝硬変にはクワシオルコル(kwashiorkor)由来肝硬変または腸吻合術由来肝硬変が含まれる。

遺伝的要因による胆管消失症候群には肝内胆管減少症または小葉間胆管減少症が含まれる。

【0013】

免疫学的機序による胆管消失症候群には上述の原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎サルコイドーシス移植に伴う胆管消失症候群、特に肝移植に伴う胆管消失症候群、が含まれる。

感染による胆管消失症候群には大腸菌等の腸内細菌上行感染による細菌性化膿性胆管炎、2次性硬化性胆管炎またはサイトメガロウイルス、レオウイルス、EBウイルス若しくは梅毒トリポネーマ等の感染による肝内胆管減少症が含まれる。

血管障害による胆管消失症候群には冠動脈または動脈血管網の血流障害による胆管虚血性壊死または胆肝障害が含まれる。

化学物質による胆管消失症候群にはサルファ剤、抗生物質、TioproninまたはMethyldopa等を起因薬剤とする小葉胆管の変性、壊死または消失が含まれる。

これらの疾患において、Fasアンタゴニストが各疾患で起こっているFasを介するアポトーシスを抑制し、疾患の予防・治療効果をもたらす。

なお、治療対象としてはヒトが重要であるが、ヒト以外の哺乳類も含みうる。

【0014】

本発明の予防・治療剤はFasアンタゴニストを有効成分とすることから分かるように、肝硬変または胆管消失症候群の重要な作用機序中におこるFasを介するアポトーシスを抑制することによって肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療効果を達成するものと考えられる。しかし、病態中でおこるFasを介するアポトーシスがどのような細胞のどの段階で起こり、それが最終的な病態にどのように影響しているかについてはほとんど分かっていない。また、肝硬変と肝炎とは前述のように病態として全く異なっている。前述の特許出願公開公報、特開平9-124509号記載の実施例のモデルでは、アポトーシスを誘引するFasリガンドの供給源としてヒトの末梢血単核細胞及びstaphylococcal enterotoxin Bを投与して、強制的にアポトーシスを引き起こさせ肝炎モデルを作成している。本発明の実施例の肝硬変または胆管消失性症候群のモデルでは直接的なアポトーシス誘因物質は投与しておらず、病態の一因がアポトーシスであるとしても、そのアポトーシスは内的に誘引されたものである。すなわち、両実施例におけるモデルは全く異なっており、そこで生じるアポトーシスも全く同じ作用機序によるものとは考えられない。これらのことから、特許出願公開公報、特開平9-124509号に記載のアポトーシスによる肝細胞の死に直接起因する肝炎と、前述の肝硬変または胆管消失症候群が全く同じアポトーシスによる疾患とは考えられない。また、特許出願公開公報、特開平9-124509号に記載のアポトーシスによる肝細胞の死に直接起因する肝炎の治療効果と、本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療効果が同様のアポトーシス抑制作用によるものとは考えられない。

【0015】

本発明で使用されるFasアンタゴニストとは、Fasを介するアポトーシスを抑制または阻害するものであれば特に限定されない。

具体的にはFas-Fasリガンドの結合を抑制する物質がある。これらは、

F a s によるシグナルの発生または伝達をいずれかの段階で遮断し、F a s / F a s リガンド系の機能または生物作用（特にF a s を介するアポトーシス）を抑制するものであれば特に限定されず、F a s リガンド若しくはF a s の作用、機能若しくは発現を抑制するもの、F a s リガンド細胞外領域若しくはF a s 細胞外領域と相互作用するもの、F a s リガンドとF a s の相互作用を抑制するもの、F a s 細胞内領域とそれと相互作用する細胞内因子との相互作用に影響するもの、またはF a s を介するアポトーシスのシグナル伝達に関する細胞内因子（例えばI C E 様プロテアーゼ）の活性を抑制するもの等のさまざまな作用機序を有するものが含まれる。また、タンパク質性の高分子物質または低分子の化合物のいずれもが含まれる。

【0016】

より具体的には、F a s を介するアポトーシスを抑制する活性を有する、F a s 誘導体、抗F a s 抗体、抗F a s リガンド抗体、F a s 若しくはF a s リガンドの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、F a s 若しくはF a s リガンドのmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、F a s の細胞内領域と相互作用する物質またはI C E 阻害剤が挙げられる。ここで、本発明で用いるF a s アンタゴニストとしては、F a s を介するアポトーシスを抑制する作用を有する、F a s 誘導体、抗F a s 抗体または抗F a s リガンド抗体が好ましい。さらに、抗F a s 抗体または抗F a s リガンド抗体はその治療対象由来のそれぞれ種のF a s またはF a s リガンドを抗原とする抗体が好ましい。例えば、ヒトの治療にはヒト由来のF a s またはF a s リガンドを抗原とする抗体すなわち抗ヒトF a s 抗体または抗ヒトF a s リガンド抗体が好ましい。

また、抗F a s リガンド抗体はキメラ抗体またはヒト化抗体が好ましい。キメラ抗体は、例えばヒトの治療にはヒト抗体からの定常領域及び非ヒト抗体からの可変領域からなるキメラ抗体が好ましい。ヒト化抗体は、例えばヒトの治療には定常領域及びフレームワーク領域（F R）がヒト由来で、相補性決定領域（C D R）が非ヒト由来であるのが好ましい。非ヒト抗体は、ヒトの治療に用いる際には比較的循環半減期が短い、重要な免疫グロブリンの機能的特性を欠くまたは免疫原性を有する等の生物学的短所が生じることがある。キメラ抗体またはヒト化

抗体はこれらを克服する。

また、本発明で用いるFasアンタゴニストは、国際特許出願公開公報WO95/13293などに記載されている適当なアッセイ法においてFas発現細胞のアポトーシスを抑制するものが好ましい（本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）。

【0017】

なお、本発明で用いられる抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、また、本発明に使用される抗体の分子種は特に限定されない。抗原に結合しFasを介するアポトーシスを阻害するかぎり、通常の形態の抗体分子であってもよいし、抗体の断片も使用することができる。これらのうちでも特に平成7年6月22日付で日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号P-15002）、さらに平成8年5月9日付で原寄託から国際寄託に移管した（受託番号FERM BP-5535）ハイブリドーマF919-9-18により産生されるマウスF919-9-18抗体が好ましい例である。

本発明で用いる抗Fasリガンド抗体または抗Fas抗体は、公知技術を利用して作製することが出来る。例えば国際特許出願公開公報WO95/13293及び国際特許出願公開公報WO95/02290等に作成方法が記載されている（本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）。

本発明で用いる事ができるキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法を用いて製造することができる。例えば国際特許出願公開公報WO95/13293の実施例1にキメラ蛋白質の作成方法が記載されている（本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）。

【0018】

本発明に用いるヒト化抗体は、Riechmann L. 等、Nature、332巻、323頁、1988年、ヨーロッパ特許公報第0239400号公報、Queen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻、10029号、1989年、国際特許出願公開公報WO90/07861、国際特許出願公開公報WO92/11018、Co等、Proc. Natl. Acad

Sci. USA、88巻、2869頁、1991年、Co等、Nature、351巻、501頁、1991年及びCo等、J. Immunol.、148巻、1149頁、1992年等に開示されている方法を用いて製造することができる（本明細書はこの文献を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）。本発明の好適な例としては、国際特許出願公開公報WO97/02290の実施例に開示されているマウス抗体F919-9-18抗体のCDRを有するヒト化抗Fasリガンド抗体が挙げられる。

【0019】

本発明で使用されているFas誘導体は、少なくともFasリガンドとの結合能を有するかまたはFasリガンドによるアポトーシスを抑制するものであれば、特に限定されない。公知のFasアミノ酸配列中に1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加といった任意の変異を有し、Fasリガンドとの結合活性を維持したまま、Fas/Fasリガンド系の生物作用（特にFasを介するアポトーシス）を抑制するものが含まれる。具体的には、Fas変異体、切断型（truncated form）Fas、キメラタンパク質、融合タンパク質または化学的に修飾されたもの等が含まれる。なお、その由来となるFasは上記の性質を有する限り、その動物種を問わないが、抗原性を考慮すればヒト由来のものを使用するのが好ましい。

【0020】

より具体的には、公知のFasの細胞外領域若しくは膜貫通領域を欠失したFas、またはFas細胞外領域と他のタンパク質とのキメラタンパク質（例えばヒトFas細胞外領域とヒト免疫グロブリンのFc領域のキメラタンパク質であるヒトFas-Fc等）が挙げられる。Fas誘導体は、いずれの製法のもので良く、公知の配列及び公知の遺伝子組換え技術等により製造することができる。例えば国際特許出願公開公報WO95/13293の実施例1及び国際特許出願公開公報WO97/42319の実施例中等に作成方法が記載されている（本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）。

また、FasのN末端に欠失を有するFas誘導体も好ましく、これらのうちでも特に平成8年3月14日付けで日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工

業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号P-15514及び受託番号P-15515）、さらに平成9年3月6日付で原寄託から国際寄託に移管（受託番号FERMBP-5854及び受託番号FERMBP-5855）されている大腸菌が含むプラスミド（pM1304及びpM1317）にコードされているFas誘導体shFas(nd29)-Fc（国際特許出願公開公報WO97/42319）は、公知のヒトFasのN末端の1番目から29番目までのアミノ酸を欠失したFas細胞外領域を含有する誘導体であり、活性が高く、本発明の肝硬変の予防・治療剤の有効成分として好適な例である（本明細書はこの文献を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）。

これらの本発明に用いるFas誘導体は、適当なアッセイ法によりFasリガンドに結合活性またはFasを介するアポトーシスの抑制活性を有することがわかる。

【0021】

本発明で使用されるFasまたはFasリガンドの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはFas若しくはFasリガンドのmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、FasまたはFasリガンドの発現を抑制するものであれば、その配列は限定されない。その例として国際特許出願公開公報WO95/13293の実施例20に開示されているFasリガンドのアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる（本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）。

【0022】

本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、肝硬変または胆管消失症候群患者に対して治療剤として使用することが可能である。また、肝疾患を有する患者に対して肝硬変または胆管消失症候群に対する予防剤として使用することが可能である。

【0023】

本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、Fasアンタゴニストを含有することを特徴とし、少なくとも一種の医薬用担体または媒体（例えば滅菌水、生理食塩水、植物油、鉱油、高級アルコール、高級脂肪酸または無害性

有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤または無痛化剤等）を適宜組み合わせることで医薬組成物やキットの形態を取ることができ、経口的に、または静脈内、冠動脈内、皮下、筋肉内、経皮、吸入、直腸内若しくは局所等の非経口的に投与することができる。

好ましくは非経口的に、全身または局所的に、急速または持続的に投与することができる。

【0024】

ヒトに対する投与量は患者の病態、年齢または投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、全身投与の場合、約0.01～100mg/Kgの範囲で適当な分割容量を選択することが可能である。しかしながら、本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤の使用はこれらの投与方法または投与量に制限されるものではない。さらに、Fas-Fasリガンドの結合を抑制する物質、Fas誘導体若しくは抗Fasリガンド抗体等の複数のFasアンタゴニストを組み合わせることで使用しても、または他の薬剤と併用しても良い。

【0025】

本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は常法に従って製剤化することができる。例えば注射用製剤は、精製されたFasアンタゴニスト（Fas-Fasリガンドの結合を抑制する物質若しくは抗Fasリガンド抗体等）を生理食塩水若しくは緩衝液等の溶剤に溶解し、必要に応じて吸着防止剤等を加えて製剤化する。また、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥させたり、凍結乾燥のための一般的な賦形剤を加えたりして製剤化しても良い。

【0026】

本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤に用いるFasアンタゴニストは、肝硬変または胆管消失症候群モデル（特に実施例のような原発性胆汁性肝硬変モデル）において、臓器及び組織の障害の抑制効果を示す。さらに、実施例では、マウスを用いたモデルで実験を行っているため、抗マウスFasリガンド抗体を使用し臓器及び組織の障害の抑制効果を示しているが、ヒトに用いる

場合は抗ヒトFasリガンド抗体により実施例と同様の効果が期待できる。

胆管消失は、原発性胆汁性肝硬変及び原発性硬化性胆管炎のような胆汁性の肝の疾患のみではなく、その他の肝硬変においてもその前病変段階で報告されている。すなわち、遺伝的要因（小葉間胆管減少症）、感染（サイトメガロウイルス、レオウイルス、AIDS及び肝炎ウイルス）、血管障害、化学物質（サルファ剤及び抗生物質等）または免疫学的機序（原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎及び移植に伴う肝疾患）等の様々な原因で起こる種々の慢性肝疾患において報告されている（肝胆膵、26巻（3）、357-362、1993年）。また、Yamada等は、肝硬変は上述の慢性肝疾患の末期的な病態であると記載している（肝胆膵、26巻（2）、181-186、1993年）。すなわち、これらの報告及び記載から考察すると、今回実施例で用いたマウス原発性胆汁性肝硬変モデルに対して臓器及び組織の障害を抑制作用を示すFasアンタゴニストが、発生原因の異なるすべての肝硬変を予防・治療可能であることが示唆される。

なお、本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、実施例において示すとおり毒性がなく、安全に使用できる。すなわち、本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、肝硬変または胆管消失症候群に対して予防、治療または改善作用が期待される。

【0027】

【実施例】

以下に実施例をもって、本発明をいっそう具体的に説明するが、これらは実施の一例として示すものであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野において慣例として用いられる略号に基づくものである。

本発明のFasアンタゴニストに含まれるFas誘導体であるshFas(nd29)-Fc及びshFas(nd29)-hingeの製法並びにアポトーシス抑制活性は国際特許出願公開公報WO97/42319の実施例2、3、5、6及び8に開示されている。また、本発明のFasアンタゴニストに含まれる抗Fasリガンド抗体の製法及びアポトーシス抑制活性は国際特許出願公開公報

WO97/02290の実施例に開示されている。

【0028】

実施例1 shFas (nd29) -Fcの毒性試験

(1) 試験方法

雄性、6週令、BDF1マウス（日本チャールス・リバー）にshFas (nd29) -Fcを10及び30mg/kgの容量で2日に1回、12日間、計7回尾静脈内から投与し、その影響を調べた。実験はコントロール群、shFas (nd29) -Fc 10mg/kg投与群及びshFas (nd29) -Fc 30mg/kg投与群の3群とし、各群3例とした。なお、各投与群の投与タンパク質量を30mg/kgと等しくするために、コントロール群には30mg/kgのヒト血清アルブミンを、shFas (nd29) -Fc 10mg/kg群にはshFas (nd29) -Fc 10mg/kgとヒト血清アルブミン20mg/kgを、shFas (nd29) -Fc 30mg/kg投与群にはshFas (nd29) -Fc 30mg/kgを投与した。

投与開始日から、2日に1回、体重測定を行った。投与開始日14日目に眼底静脈より採血を行い血球数を測定後、血漿を調製し、GOT、GPT及びクレアチニンを測定した。また、採血終了後、剖検を行い、目視により主要臓器（肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓及び腸）の変化を調べた。血球数の測定はSysmex社の自動血球測定装置K-2000を用いて行った。GOT、GPT及びクレアチニンはオートアナライザーCOBAS FARA（ロッシュ）を用いて測定した。

(2) 試験結果

10及び30mg/kgのshFas (nd29) -Fcを2日に1回、12日間、計7回マウスに投与しても体重増加、血球数、肝臓（GOT及びGPT）、腎臓（クレアチニン）並びにその他の主要臓器（肉眼的所見）への有意な影響は認められなかった。

【0029】

実施例2 マウス原発性胆汁性肝硬変モデルにおけるshFas (nd29) -Fcの投与効果

(1) マウス原発性胆汁性肝硬変モデルの作製

マウス原発性胆汁性肝硬変モデルの作製は、Howellらの方法(J. Immunology、143巻、476-483、1989年)に従って行った。すなわち、雌性、4週齢、Balb/cマウス(日本SLC)に半致死量である600radの放射線を照射した(day 0)。放射線照射の4~6時間後、放射線照射したBalb/cマウスに 3×10^7 個のB10D2マウス由来脾臓リンパ球を尾静脈から移植した。移植21日目に肝臓を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、組織切片を作製した。組織切片をヘマトキシリン-エオジン染色し顕微鏡下で観察して、胆管における炎症(細胞浸潤、組織障害)の有無の確認及び病理学的評価を行った。

また、放射線照射したBalb/cマウスに移植したB10D2マウス由来脾臓リンパ球は以下のように調整した。B10D2マウス(日本SLC)の脾臓をハanks液(日水製薬)中でピンセットを用いてほぐした後、遠心して細胞を得、0.017Mトリス-0.747%塩化アンモニウム溶液中に懸濁し、不要な赤血球を溶血させた。得られた細胞をさらにハanks液で洗浄して、B10D2マウス由来脾臓リンパ球とした。

(2) shFas(nd29)-Fcの投与

shFas(nd29)-Fc群には、B10D2マウス由来脾臓リンパ球移植の直前(day 0)、1日後(day 1)及び7日後(day 7)の計3回、尾静脈から $20 \mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ /マウスの用量で投与した($n=4$)。コントロール群には生理食塩水を 0.2 ml /マウスの用量で尾静脈から投与した($n=5$)。

(3) 病理学的評価

表1に示したJ. Vielingの胆管炎基準をもとにスコア化し、評価した。

表 1

グレード	門脈の炎症	胆管の障害
0	30%未満	正常
1	30～40%未満	胆管周囲の炎症
2	40～60%未満	胆管周囲の炎症と異常細胞の出現
3	60～80%未満	胆管の炎症
4	80%以上	胆管構造の乱れもしくは破壊

(4) 結果

結果を表2に示した。

表2 shFas (nd29) -Fcの胆管炎に対する投与効果 (day21)

群	胆管に炎症の認められた 個体の割合 (%)	平均病理学的 スコア
コントロール	100 (5例中5例)	1.6
shFas (nd29) -Fc	25 (4例中1例)	0.25

コントロール群は5例中5例に胆管の炎症が認められたのに対し、shFas (nd29) -Fc投与群は胆管の炎症が認められたのは4例中1例であった。また、平均病理スコアにおいても、shFas (nd29) -Fc投与群のスコアはコントロール群よりも低かった。

【0030】

実施例3 抗マウスFasリガンド抗体の作製、生産及び精製

(1) 抗マウスFasリガンド抗体の作製

遺伝子工学的手法を用いたマウスFasリガンドWX2 (J. Immunology, 157巻、3918-3924頁、1996年) 由来のマウスFasリガンド細胞外領域とマウスCD40リガンドの細胞内領域、膜貫通領域および細胞外領域の一部 (N末端から78アミノ酸) を融合したキメラ蛋白質をコードする遺伝子をヒトエロンゲーションファクター (EF) プロモータ (ミズシマーナガタ (Mizushima-Nagata), Nucleic Acids Research, 18巻、5322頁、1990年) の下流に有するプラスミドを作製した。上記プラスミドをWR19L細胞にトランスフェクトし、細胞膜上にマウスFasリガンドを発現している組換え細胞W40LFLを得て、投与抗原として用いた。免疫動物としてアルメニアハムスターを用いた。フロイント完全アジュバントと混合した 1×10^7 個のW40LFLをアルメニアハムスターの皮下に投与し、1ヶ月後にPBSに懸濁した 2×10^7 個のW40LFLを皮下に投与した。さらに1ヶ月後、PBSに懸濁した 5×10^6 個のW40LFLをフットパッドに投与した。3日後、リンパ節細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞P3-X63-Ag8-U1 (P3-U1) と細胞融合した。HAT培地 (ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン) による選択の後、生育したハイブリドーマの中から、その培養上清中にマウスFasリガンドによる細胞障害性を中和する活性を有するハイブリドーマFLIM58を得た。

(2) FLIM58の生産および精製

ハイブリドーマFLIM58を無血清培地Hybridoma-SFM (GIBCO BRL) にて培養し、その培養上清をプロテイン-Aカラム (PROSEP-A, Bioprocessing) で精製し、精製抗体FLIM58を得た。蛋白濃度は280nmの吸光度より算出した。

【0031】

実施例4 抗マウスFasリガンド抗体FLIM58の毒性試験

(1) 方法

雄性、8週齢、DBA/1JマウスおよびC3H/Heマウス（日本チャールス・リバー）を用いた。抗マウスFasリガンド抗体FLIM58を100mg/30ml/kgの用量で尾静脈から投与した。またコントロール群には生理食塩水を30ml/kgの用量で尾静脈から投与した。2種の系統ともに各群3例とした。観察期間を7日間とし、体重測定、血液学的検査（赤血球、白血球、血小板）、血液生化学的検査（GOT、GPT、尿素窒素）、肉眼による剖検を行った。

（2）結果

抗マウスFasリガンド抗体FLIM58投与群の投与後の体重増加、血液学的検査値（赤血球、白血球、血小板）、血液生化学的検査値（GOT、GPT、尿素窒素）はコントロール群と比べて差を認めなかった。また、肉眼による剖検所見においても抗マウスFasリガンド抗体FLIM58投与群に異常は認められなかった。

【0032】

実施例5 マウス原発性胆汁性肝硬変モデルにおける抗マウスFasリガンド抗体FLIM58の投与効果

（1）マウス原発性胆汁性肝硬変モデルの作製

実施例2と同様の方法にて作製した。

（2）FLIM58の投与

FLIM58投与群には、B10D2マウス由来脾臓リンパ球移植の直前（day 0）、1日後（day 1）及び7日後（day 7）の計3回、尾静脈から20μg/0.2ml/マウスの用量で投与した（n=5）。コントロール群には生理食塩水を0.2ml/マウスの用量で尾静脈から投与した（n=5）。

（3）病理学的評価

実施例2と同様の方法にて評価した。

（4）結果

結果を表3に示した。

表3 FLIM58の胆管炎に対する投与効果 (day 21)

群	胆管に炎症の認められた個体の割合 (%)	病理学的スコア
コントロール	100 (5例中5例)	1.6
FLIM58	40 (5例中2例)	0.6

コントロール群は5例中5例に胆管の炎症が認められたのに対し、FLIM58投与群は胆管の炎症が認められたのは5例中2例であった。また、平均病理スコアにおいても、FLIM58投与群のスコアはコントロール群よりも低かった。

【0033】

【発明の効果】

本発明のFasアンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、Fasを介するアポトーシスの抑制作用により、特にFasを介した細胞の死に代表されるFas/Fasリガンド系の生物作用等のアポトーシスが関与する肝硬変または胆管消失症候群の予防または治療効果を有する。従って、本発明のFasアンタゴニストは、Fasを介した細胞の死等、Fasを介するアポトーシスが関与する肝硬変または胆管消失症候群の疾患の予防・治療剤として期待される。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤の提供。

【解決手段】 Fas アンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤の提供。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000181147

【住所又は居所】

東京都新宿区四谷1丁目7番地

【氏名又は名称】

持田製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100080159

【住所又は居所】

東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナ
カイビル3階 いおん特許事務所

【氏名又は名称】

渡辺 望稔

【選任した代理人】

【識別番号】

100090217

【住所又は居所】

東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナ
カイビル3階 いおん特許事務所

【氏名又は名称】

三和 晴子

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000181147]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区四谷1丁目7番地
氏 名	持田製薬株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)
